2008. 3. 27 Mamiko HIROSE

Protocols for *Symbiodinium* identification (ver. 2.0)

Table of contents

1. DNA extraction
- 1.1a CHAOS method ---------- 2
- 1.1b SDS-Proteinase K method ---------- 2
- 1.1c CTAB method ---------- 4
- 1.1d Others (Frozen sample, Ethanol fixed sample) ---------- 5
- 1.2a DNA isolation by standard phenol/chloroform method ---------- 6
- 1.2b DNA isolation by commercial kit ---------- 7

2. PCR-RFLP; identification of *Symbiodinium* clade
- 2.1 PCR amplification of small subunit ribosomal RNA (18S) ---------- 9
- 2.2 PCR amplification of large subunit ribosomal RNA (28S) ---------- 10
- 2.3 Purification of PCR products by ethanol precipitation ---------- 11
- 2.4 Purification of PCR products by PEG precipitation ---------- 12
- 2.5 Restriction enzyme / introduction ---------- 13
- 2.6 Identification of *Symbiodinium* clade
  - 2.6.1 Digestion of 18S rRNA with restriction enzyme ---------- 14
  - 2.6.2 Digestion of 28S rRNA with restriction enzyme ---------- 16

3. PCR-DGGE; profiling of *Symbiodinium* types using ITS2 region
- 3.1 PCR amplification of ITS2 with GC-clump ---------- 18
- 3.2 Preparation of gradient gel ---------- 21

4. Sequencing
- 4.1 Sequencing reaction for Beckman CEQ 8800 ---------- 27
- 4.2 CEQ 8800 operation ---------- 29

5. PCR products sub-cloning ---------- 31

6. Basic Reagent ---------- 35

1. DNA extraction

1.1a CHAOS method

生物種（サンゴ種）によっては多糖や夾雑物を多く含むものがあり，genomic DNAの収量が少なかったり，PCRで増幅されにくいDNAしか抽出できないことがある．その場合，CTAB solutionを併用すると効率よくきれいなDNAが抽出できることがある（詳しくは1.1c CTAB methodsを参照）．

CHAOS solution; オートクレーブ滅菌はしない.

Reagent	Amount	Final Conc.
Guanidine thiocyanate	50 g	4M
Salkosyl	0.5 g	0.5%
Tris-HCl (pH 8.0)	1M stock 2.5 ml	25ml
2-Mercaptoethanol	0.7 ml	0.1M
dH_2O	Up to 100 ml	

guanidineおよびmercaptoethanolはタンパクの3次元構造を壊す試薬.古くなると作用効果が弱くなるので，mercaptoethanolを除いたCHAOS solutionを分注して凍結しておき，使用直前に必要量のmercaptoethanol（7µl/ml)を加えることを勧める．なお，mercaptoethanoは還元作用も強く，臭いもきついので手袋をしてドラフトの中で作業をすること.（余談ではあるが，guanidine saltはchaotropic agents（水の構造を壊乱するような試薬）と呼ばれていることからCHAOS solutionと呼ばれていると推測される．）

1. サンゴを細かく割り，CHAOS solutionを浸す.
   セラムチューブ(2ml)やアシストチューブ(7ml)等の滅菌済み，かつキャップがしっかり閉まるものが良い.ファルコンチューブはメーカーにより，蓋が劣化して漏れるものがあるので要注意(ファルコン社とコーニング社は経験的に1-2年はOK).

   樹状サンゴなら2cm長，葉状サンゴなら2cm^2の群体片で良い.
   また塊状ハマサンゴのようなサンゴ組織層に対して骨格部分が多い塊状サンゴの場合は，タガネとハンマー等を用いて骨格部分を除き少し大型のチューブ（容量5-15mlぐらい）に小さく割ったサンゴ小片(サンゴ組織の総面積は2-5cm^2でよい)を入れ，グアニジン溶液に浸すとよい.

2. その後，フェノール／クロロホルムで抽出，エタノール沈殿，必要に応じてRNase処理を行う．詳しくは1.2a DNA isolation by standard phenol/chloroform methodを参照．または市販のDNA抽出キットを用いてDNAを抽出する．詳しくは1.2b DNA isolation by commercial kitを参照.

1.1b SDS-Proteinase K method

クラゲやイソギンチャク等はCHAOS methodsでDNAが取れにくい場合がある．その場合，試料をDNA extraction buffer中でモホジネイトし，SDS-Proteinase K中で変性後，フェノール／クロロホルムで抽出，エタノール沈殿をしてみるとよい．エタノール保存されたサンプルはSDS-ProK法で抽出する．サンゴの場合，滅菌した乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で骨格を細かく砕き，DNA extraction bufferに溶解する．さらに，多糖や夾雑物が多い場合（例えばミ

ドリイシ科，キクメイシ科など）は，1.1c CTAB methodを併用すると効率よくきれいなDNAが抽出できることがある．

DNA extraction buffer; autoclave

Reagent	Amount	Final Conc.
EDTA (pH 8.0)	0.5M stock 5 ml	50 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	1M stock 2.5 ml	50 mM
NaCl	2.34 g	0.4 M
dH_2O	Up to 100 ml	

10% SDS (not autoclave)
10mg/ml Proteinase K (not autoclave, store at -20ºC)

1. 生の試料，70%*または100% EtOH中で保存された試料をDNA extraction buffer中でホモジネイトする．
   *エタノールは滅菌Milli Q水で希釈したものを使用．サンプルは-20°Cで保存．

2. SDS (final 1%)と2-メルカプトエタノール(final 2%)を加えて65°Cで1h インキュベート．

3. Proteinase K (final 0.5 mg/ml)を加えて37°Cで組織が完全に溶解するまでインキュベート．

4. その後，フェノール／クロロホルムで抽出，エタノール沈殿，必要に応じてRNase処理を行う．詳しくは1.2a DNA isolation by standard phenol/chloroform methodを参照．

1.1c CTAB method

CTAB: Cetyltrimethylammnonium bromide

CTABは陽イオン性の変性剤であり，低イオン溶液中で核酸と酸性の多糖を沈殿させる．このとき，タンパクと中性多糖は溶液中に残る．高イオン濃度下ではCTABはタンパクと大部分の酸性多糖と複合体を形成するが，核酸は溶液中に残る．この性質を利用し，植物等のポリサッカライドを多く含む組織からのDNA抽出に用いられる．

Coffroth et al.(1992)で用いられたCTAB solution

20 mM EDTA
100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
4M NaCl
2% CTAB
0.2 % 2-mercaptoetanol
add Proteinase-K (final concentration 0.1 mg/ml)

2X CTAB solution (Hirose original)

CHAOS solutionまたはDNA extraction bufferを用いて，組織を溶解またはホモジネイトしたサンプルを用いた場合に併用するCTAB solution

Reagent	Amount	Final Conc.
EDTA (pH 8.0)	0.5M stock 2 ml	20 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	1M stock 5 ml	100 mM
NaCl	5M stock 14 ml	1.4 M
CTAB	2 g	4%
dH_2O	Up to 50 ml	

CTABは発泡性があるので，オートクレーブしない． EDTA, Tris, NaCl, DWは全て滅菌済みのstockを用いて試薬の調整を行う．

I. CHAOS + CTAB solution

サンゴ組織の溶解したCHAOS solution　300μl
2X CTAB　300μl
65°Cで30-60min インキュベート．

後は，1.1 DNA extraction CHAOS methodsを参照して，通常のフェノール／クロロホルム処理，エタノール沈殿(必要に応じてRNase処理)を行い，DNAを抽出する．

II. DNA extraction buffer + CTAB solution

〈プラヌラ幼生，サカサクラゲのポリプ体，クラゲ体などの場合〉

1. サンプルを多めの70% EtOHで固定し，-20°Cで保存．

2. エタノールをできるだけピペットで吸い取り，DNA extraction buffer 500μlで1回すすぐ．

3. DNA extraction buffer 300μl中で，マイクロホモジネータで組織をホモジネイト．

4. クラゲホモジュネイト溶液　300μl
   2X CTAB solution　300μl
   10% SDS　60μl
   2-melcaptethanol　13μl

   65°Cで1h インキュベート．

5. 10mg/ml Proteinase Kを33μl 加えて37°Cで組織が完全に溶解するまで（およそ3-5時間）インキュベート．

6. サンプルはtotalでおよそ700μlになっているはずなので，このあと1.1 DNA extraction CHAOS methodsを参照して，通常のフェノール／クロロホルム処理，エタノール沈殿，必要に応じてRNase処理を行い，DNAを抽出する．

1.1d Others

I. 凍結サンゴサンプルからのDNA抽出

1. Water pickを用いて, DNA extraction bufferで(ユニパックの中で)サンゴ組織を剥がす.

2. 遠心して細胞ペレットを回収.

3. DNAの抽出を行う.

II. エタノール保存サンプルからの褐虫藻DNA抽出

1. サンゴ片をエタノールに入れる.

2. 沈殿物を遠心により回収（エタノール中で褐虫藻がサンゴから遊離し, 沈殿する）.乾燥してエタノールを飛ばした後, 下記のQIAGEN社のキット等を用いてDNAを抽出する.

*この方法は, サンゴ細胞からDNAを抽出するのには向いていない.

1.2a DNA isolation by standard phenol/chloroform method

1. サンゴ組織が溶解したCHAOS solution 300μlを1.5mlマイクロチューブに移し, incubate; 55℃, 1h.

2. Tissue (CHAOS) solution 300μl
   Phenol TE* 150μl
   CIA** 150μl
   mix by voltex
   centrifuge 14000rpm, 4℃, 15min
   ＜2-3times＞ depend on specimen
   *Phenol TE: TE飽和フェノール(pH 8.0)
   **CIA; クロロホルム：イソアミルアルコール = 24:1

3. Aqueous phase 300μl
   CIA 300μl
   mix by voltex
   centrifuge 14000rpm, 4℃, 15min

4. Aqueous phase 300μl
   3M NaOAC pH 5.2 (酢酸ナトリウム) 30μl (水層の1/10量)
   Isoropanol 300μl (水層と等量)
   gently mix
   (incubate -20℃, 30min. この操作はしなくても良い. この状態で保存可.)
   centrifuge 14000rpm, 4℃, 25min

5. Aqueous phase waste
   70% EtOH 500 μl
   centrifuge 14000 rpm, 4℃, 5min

6. Dry

7. resuspend in 50-100μl TE

<Option>
   8. RNase A (10mg/ml) 1μl
      Incubate 37℃, 1h

   9. add TE up to 100μl
      Phenol TE 50μl
      CIA 50μl
      mix by voltex
      centrifuge 14000rpm, 4℃, 20min

10. Aqueous phase　　100μl
    CIA　　100μl
    mix by voltex
    centrifuge 14000rpm, 4℃, 20min

11. Aqueous phase waste　　100μl
    3M NaOAC pH 5.2（酢酸ナトリウム）　10μl
    Isopropanol　　100μl
    gently mix (incubate -20℃, 30min)
    centrifuge 14000rpm, 4℃, 25min

12. Aqueous phase waste
    70% EtOH 300μl
    centrifuge 14000rpm, 4℃, 5min

13. Dry
    resuspend in 30-50μl TE

1% agarose gelにて1-5μl 電気泳動し，濃度と品質をチェック.

1.2b DNA isolation by commercial kit

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いたCHAOS solution からのDNA抽出

0. サンゴ片をCHAOS solution中で保存.

1. サンゴ組織の溶解した CHAOS solution, 100μl と Buffer ATL（または DNA extraction buffer)，100μl をvoltexで撹拌した後，インキュベート: 55°C, 1h.

2. voltexで20秒撹拌した後，Buffer AL, 200μl加え，voltexで撹拌し，インキュベート: 70°C, 10min

3. 100% EtOH 200μl加え，voltexで転倒混和（このとき，DNAが析出する).

4. サンプルをDNeasy Mini spin column (2ml collection tube にセットされているもの)に移し，遠心: 8,000rpm, 1min, 4°C.

5. ろ液を捨て，Buffer AW1, 500μlを加え，遠心: 8,000rpm, 1min, 4°C.

6. ろ液を捨て，Buffer AW2, 500μlを加え，遠心: 8,000rpm, 3min, 4°C.

7. DNeasy Mini spin columnを1.5mlマイクロチューブ(kitには付いていない)に移し，Buffer AEを100μl加え，室温で３分置く.

8. 遠心: 8,000rpm, 3min, 4°C.

１％アガロースゲルで5µl 泳動して濃度と品質をチェック.Nano drop で濃度測定. このうち, 1µl を 24µl の PCR mixture に加えればよい.

AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (BIO-RAD)を用いた CHAOS solution からの DNA 抽出

0. サンゴ片を CHAOS 溶液中に保存.

1. サンゴ組織の溶解した CHAOS solution 100µl に Lysis buffer(または DNA extraction buffer) 200µl 加え, インキュベート: 55°C, 1h

2.サンプルを室温まで下げて, Protein Precipitation Solution (Kit 添付)を 100µl 加え,voltex でよく混ぜた後,氷上で10min 静地.その後遠心: 12,000rpm, 5min, 4°C.

3. (沈殿物を取らないように) 上清を新しい 1.5ml チューブに移し, 上清と等量 (350-400µl)の 100%イソプロパノールを加え, 転倒混和. その後遠心: 12,000rpm, 15min, 4°C.

４. 上清を捨て, 70% エタノールを 800ml 加える. その後遠心: 12,000rpm, 5min, 4°C.

５. 上清を捨て, 乾燥 (室温で 30-60min, もしくはエバポレーターで 15min)

６. DNA Hybridization Solution (Kit 添付)を 50µl 加え, DNA を溶解.

１％アガロースゲルで3µl 泳動して濃度と品質をチェック.Nano drop で濃度測定. このうち, 1µl を 24µl の PCR mixture に加えればよい.

2. PCR-RFLP; identification of *Symbiodinium* clade

2.1 PCR amplification of small subunit ribosomal RNA (18S rDNA)

zoox specific primer (Rowan et al. 1991)
ss5Z (5'-GCA GTT ATA (A/G)TT TAT TTG ATG GT(C/T) (A/G)CT GCT AC-3')
ss3Z (5'-AGC ACT GCG TCA GTC CGA ATA ATT CAC CGG-3')

1. PCR反応液

Reagent		For 25µl PCR	For 50µl PCR
	Template DNA	Xμl(3-25ng)	Xμl(5-50ng)
2)	10 X PCR buffer	2.5 µl	5 µl
3)	dNTP (2.5mM each)	2 µl	4 µl
4)	primer1 (10pmol)	0.5 µl	1 µl
5)	primer2 (10pmol)	0.5 µl	1 µl
6)	*Taq* polymerase (5U/μl)	0.125 µl	0.25 µl
1)	dH_2O	Up to 25 µl	Up to 50 µl

1.1 サンプル数分の試薬を括弧内の番号順に1.5mlのマイクロチューブに入れて，premixとする(酵素は気泡に弱いので，泡を作らないようにする).

1.2 24μlまたは49μlずつ0.2mlのマイクロチューブに分注し，template DNAを加える.

2. サーマルサイクラーが94℃に上がってから，チューブをセットする.

Cycle

94°C	3:00 min	1 cycle
↓		
94°C	1:00 min	35 cycles
58°C	1:00 min	
72°C	2:30 min	
↓		
72°C	7:00	1 cycle
↓		
4°C	hold	

3. PCR products 5μlを1% agarose gelで電気泳動し，目的の産物が増幅されているか確認する.
Small subunit ribosomal RNAをprimers ss5Z/ss3Zで増幅した場合,約1,500-1600bpの増幅産物が得られる.

2.2 PCR amplification of large subunit ribosomal RNA (28S)

zoox specific primer (Zadoya et al. 1995)
lsu-UFP1 (5'-CCC GCT AAT TTA AGC ATA TAA GTA-3')
lsu-URP1 (5'-GTT AGA CTC CTT GGT CGT GTT TCA-3')

1. PCR反応液

Reagent		For 25µl PCR	For 50µl PCR
	Template DNA	Xμl(3-25ng)	Xμl(5-50ng)
2)	10 X PCR buffer	2.5 µl	5 µl
3)	dNTP (2.5mM each)	2 µl	4 µl
4)	primer1 (10 pmol)	0.5 µl	1 µl
5)	primer2 (10 pmol)	0.5 µl	1 µl
6)	*Taq* polymerase (5U/μl)	0.125 µl	0.25 µl
1)	dH_2O	Up to 25 µl	Up to 50 µl

1.1 サンプル数分の試薬を括弧内の番号順に1.5mlのマイクロチューブに入れて，premixとする(酵素は気泡に弱いので，泡を作らないようにする).

1.2 24μlまたは49μlずつ0.2mlのマイクロチューブに分注し，template DNAを加える.

2. サーマルサイクラーが94℃に上がってから，チューブをセットする.

Cycle

94°C	5:00 min	1 cycle
↓		
94°C	0:45 min	35 cycles
52°C	0:45 min	
72°C	1:30 min	
↓		
72°C	7:00	1 cycle
↓		
4°C	hold	

3. PCR products 5μlを1% agarose gelで電気泳動し，目的の産物が増幅されているか確認する.

Large subunit ribosomal RNAをprimers lsu-UFP1/lsu-URP1で増幅した場合，約700bpの増幅産物が得られる.

2.3 Purification of PCR products by ethanol precipitation

通称「エタ沈」. 最もオーソドックスなDNAの精製法.

1. PCR products	20μl	45μl
3M NaOAC(pH 5.2)	2μl	4.5μl (1/10 volume)
isopropanol	25μl	50μl (approx. equal volume)

(1* -20 C°で30minインキュベート,一晩静置も可. -20°Cで静置せずにすぐに遠心してもDNAの回収率に問題はない.)

2. centrifuge 12,000rpm, 4C°, 25min

3. 溶液を捨てる(DNAは沈殿物として, チューブの管壁に密着しているが, 滑りやすいので注意する).

4. rinse (70% EtOH) 180μl
centrifuge 12,000rpm, 4C°, 5min

6. dry (真空ポンプで6-7分, もしくは室温放置1-2時間)

7. 15-25μl DWに溶解 (PCR産物の量による.25μlのPCR反応液の場合, 15μlのDWに溶解すると大体うまくいく).

8. 1μlのDNA溶液を電気泳動(1% agarose gel)し, 濃度を推定する (慣れないうちは濃度が分かっているDNAマーカーと共に泳動する).

2.4 Purification of PCR products by PEG precipitation

PEG (polyethylene glycol) 8000
13 % PEG
1.6M NaCl
*autoclave

1. PCR products　20μl
   PEG solution　20μl（等量）
   on ice 30 min （この冷却は必須．ただし長時間放置すると，プライマー等小さい分子も沈殿してしまう）

2. centrifuge: 12,000rpm, 4C^{o}, 20min

3. 溶液を捨てる(DNAは沈殿物として，チューブの管壁に密着しているが，滑りやすいので注意する．）

4. rinse（70% EtOH ）100μl
   centrifuge: 12,000rpm, 4C^{o}, 5 min

5. dry（真空ポンプで6-7分，もしくは室温放置1-2時間）

6. 15-25μl DWに溶解.

7. 1μlのDNA溶液を電気泳動(1% agarose gel)し，濃度を推定する（慣れないうちは濃度が分かっているDNAマーカーと共に泳動する）.

2.5 restriction enzyme / introduction

制限酵素(restriction enzyme)は制限エンドヌクレアーゼ(restriction endonuclease)ともいわれるように，エンドヌクレアーゼの一種であり，DNAの特定の配列を認識してその部位（またはその部位から一定の距離離れた部位）を切断する.

反応条件について

制限酵素は自然界の様々なバクテリアから単離されており，その起源の違いに応じて反応の至適条件にバリエーションがある．特に，最適な塩濃度は制限酵素の種類によってかなり異なる．本来ならば各々の制限酵素に最適な反応バッファーを用いるのが望ましいが，各メーカーから用意されている代表的なバッファーから酵素活性を十分に発揮できるものを選んで酵素に添付することが一般的．各バッファーと酵素の活性についてはメーカーのカタログに記載されているので各自で確認する．代表的なバッファー(ユニバーサルバッファー)の組成もメーカーのカタログに載っているので確認する．バッファーは通常は10倍濃度に調整されており，反応系に1/10倍量だけ加える.

酵素類は凍結による失活を防止するために，グリセロールが50%添加してある．反応液中の高濃度のグリセロールは，酵素の活性を阻害したり，star活性（認識配列の特異性が緩み，類似の別の配列を切断すること）を起こしたりするので，反応液に加える酵素の容量は全体の1/10以下にすることが極めて重要.

反応の温度は通常37℃であるが，*Taq* Iのように65℃が最適温度である例もあり，使用する酵素が何℃で反応するか，カタログで必ず確認すること.

制限酵素活性の単位 U：1Uは、各酵素反応液50μl中、原則として37℃で1時間に1μgのλDNAを完全に分解する酵素量.

2.6 Identification of *Symbiodinium* clade

2.6.1 Digestion of 18S rRNA with restriction enzyme; identification of *Symbiodinium* clade

制限酵素処理は通常，精製してDWに再溶解したものをDNAサンプルとして用いるが，制限酵素*Taq* Iの最適反応条件と*Taq* polymerase で行ったPCR反応液の組成が似ている為（同じバクテリア由来の酵素の為），*Taq* I酵素反応のみを行う場合は，PCR産物を精製せず直接反応液に加えても*Symbiodinium*のクレード解析は可能（かなりの時間短縮になる）．

制限酵素：*Taq* I

1. 反応液

Reagent	Amount	Final Conc.
精製済み PCR 産物	50-100 ng	
2)10X *Taq* I buffer	1.0 µl	1X
3)0.1% BSA	1.0 µl	0.01%
4)*Taq* I (10U/µl)	0.2 µl	
1)dH_2O	Up to 10 µl	

＊ PCR産物を精製せずに直接*Taq* I処理する場合.

Reagent	Amount	Final Conc.
未精製 PCR 産物	5 µl	
2)10X *Taq* I buffer	1.0 µl	1X
3)0.1% BSA	1.0 µl	0.01%
4)*Taq* I (10U/µl)	0.2 µl	
1)dH_2O	2.8 µl	

上記の溶液をPCR用の0.2 mlマイクロチューブに入れる.

サンプル数が多い場合は，サンプル数分の試薬を括弧内の番号順に1.5mlのマイクロチューブに入れてpremixを作り分注する.

酵素は気泡に弱いので，泡を作らないようにする.

2. サーマルサイクラー(PCRマシーン)にセットし，65℃で3時間反応させる.

3. その間に，解析用2.5% 相当agarose gelを作る.

Syner gel 0.9 % (0.09g / 10ml)
agarose 0.7 % (0.07g / 10ml)

3.1 濃度が高いので,加熱前に良く振ってagaroseの粉末がTAE中で均一になるようにする.

3.2 レンジ弱でこまめに取り出して振りながら溶解する.一気に沸騰して，塊状に固まってしまったアガロースはもう溶解しないので注意する.

4. 酵素処理が終わったら，DNA断片にloading bufferの色素がかぶらないよう，色素を選んで反応産物を全て泳動し，クレード判別を行う．
分子量マーカーは100bpラダーマーカーを使用．

*Clade判別用loading buffer
0.2% BPB (Bromo phenol blue)
2mM EDTA (pH 8.0)
50% glycerol
in 滅菌 MilliQ

このloading bufferを使わずに,各種酵素等に添付されてくるX6やX10のloading bufferを用いても構わない．しかし，肝心のバンドと色素が被ってしまうと判断に迷うことや，見栄えが良くないので，以下のloading buffer を自分で用意すると，「きれいなデータの出せる研究者」の仲間入りが出来る．

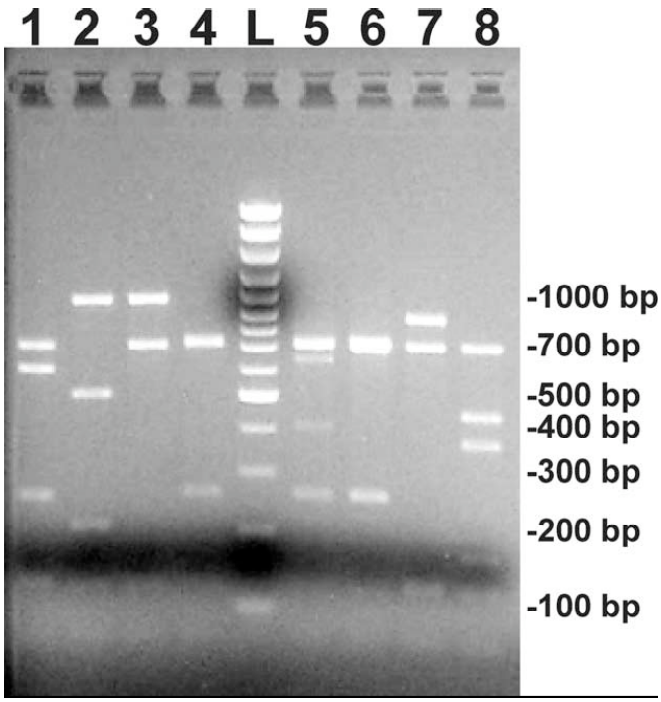


Fig. 2. n18S-rDNA TaqI-generated RFLPs
1,clade A; 2,clade B; 3,clade C; 4,clade D;
5,clade D; 6,clade D; 7,clade E; 8,from *P. damicornis*
Santos et al. (2000) MPE 23:97-111より

2.6.2 Digestion of 28S rRNA with restriction enzyme; identification of *Symbiodinium* clade

制限酵素：*Taq* I

1. 反応液

Reagent	Amount	Final Conc.
精製済みPCR産物	50-100 ng	
2)10X *Taq* I buffer	1.0 µl	1X
3)0.1% BSA	1.0 µl	0.01%
4)*Taq* I (10U/µl)	0.2 µl	
1)dH_2O	Up to 10 µl	

＊PCR産物を精製せずに直接*Taq* I処理する場合.

Reagent	Amount	Final Conc.
未精製PCR産物	5 µl	
2)10X *Taq* I buffer	1.0 µl	1X
3)0.1% BSA	1.0 µl	0.01%
4)*Taq* I (10U/µl)	0.2 µl	
1)dH_2O	2.8 µl	

2. サーマルサイクラー(PCRマシーン)にセットし，65℃で3時間反応させる.

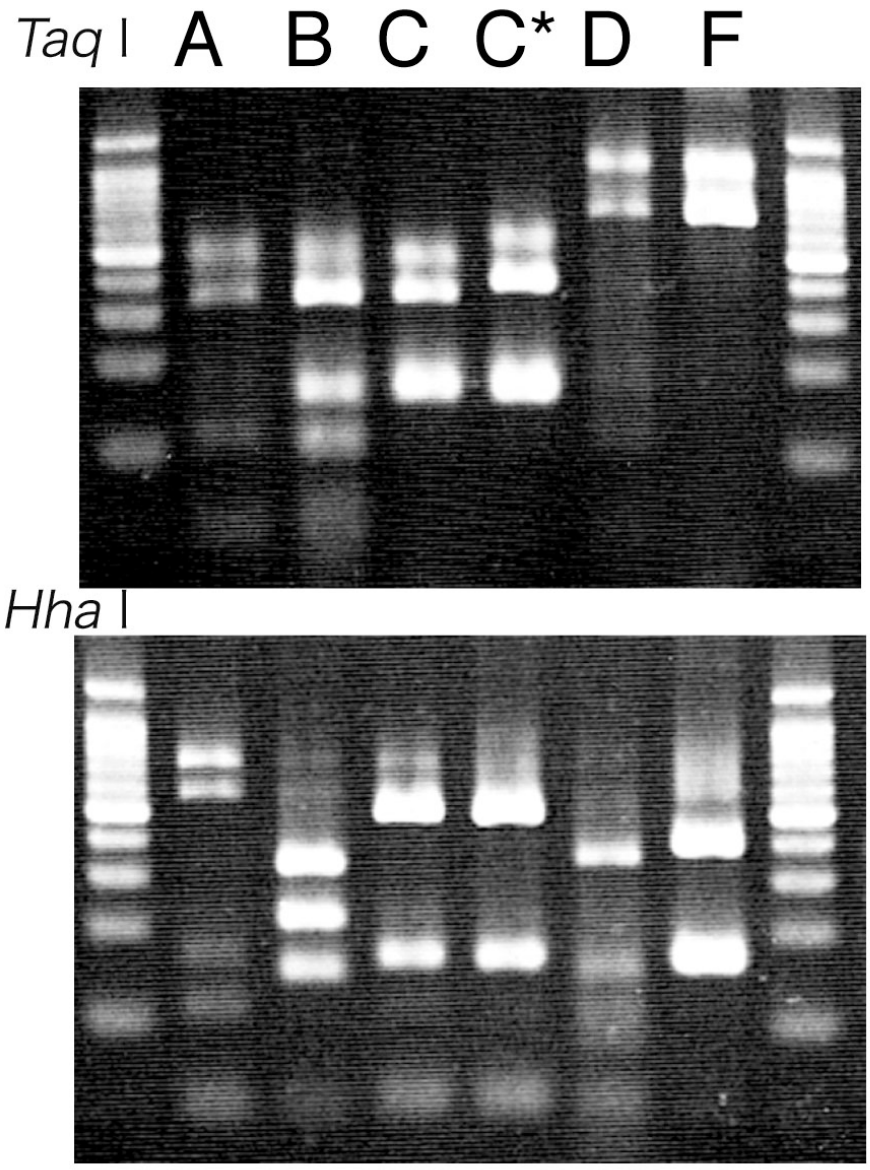
3. その間に，解析用4% 相当agarose gelを作る.
   Syner gel　1.65 % (0.165g / 10ml)
   agarose　0.7 % (0.07g / 10ml)

   3.1 濃度が高いので，エタノールでアガロース混合粉末を溶解してからTAEを加え，均一になるようにする.
   100% ethanol 2ml/１g混合粉末 (Syner gel + agarose)

   3.2 レンジ弱でこまめに取り出して振りながら溶解する.一気に沸騰して，塊状に固まってしまったアガロースはもう溶解しないので注意する.

4. 酵素処理が終わったら，DNA断片にloading bufferの色素がかぶらないよう，色素を選んで反応産物を全て泳動し，クレード判別を行う.
   分子量マーカーは100bpラダーマーカーを使用.

制限酵素 *Taq* IおよびHha Iによる
28S rDNA領域を用いた*Symbiodinium*のタイピング



3. PCR-DGGE; profiling of *Symbiodinium* types using ITS2 region

3.1 PCR amplification of ITS2 with GC-clump

zoox specific ITS2 primer (LaJeunesse and Trench 2000)
ITSintfor2 (5'-GAA TTG CAG AAC TCC GTG-3')
ITSrev2GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GGG ATC CAT ATG CTT AAG TTC AGC GGG GT-3')
下線部がGC-clump

1. PCR反応液

Reagent		For 25µl PCR	For 50µl PCR
	Template DNA	Xμl(3-25 ng)	Xμl(5-50 ng)
2)	10 X PCR buffer	2.5 µl	5 µl
3)	dNTP (2.5mM each)	2 µl	4 µl
4)	primer1 (10 pmol)	0.5 µl	1 µl
5)	primer2 (10 pmol)	0.5 µl	1 µl
6)	*Taq* polymerase (5U/μl)	0.125 µl	0.25 µl
1)	dH_2O	Up to 25 µl	Up to 50 µl

1.1 サンプル数分の試薬を括弧内の番号順にを1.5mlのマイクロチューブに入れて，premixとする(酵素は気泡に弱いので，泡を作らないようにする).

1.2 24μlまたは49μlずつ0.2 mlのマイクロチューブに分注し，template DNAを加える.

2. サーマルサイクラーが94℃に上がってから，チューブをセットする.

Cycle = touch down methods

94°C	5:00 min	1 cycle
↓		
94°C	0:45 min	
X°C	0:45 min	20 cycles*
72°C	1:00 min	
↓		
94°C	0:45 min	
52°C	0:45 min	15 cycles
72°C	1:00 min	
↓		
72°C	20:00	1 cycle
↓		
4°C	hold	

* touch down methods
アニーニング温度を62°Cから１サイクルごとに0.5°Cずつ下げて行き，52°Cまで下がったら，アニーリング温度52℃でさらに15サイクル増幅する．このtouch down方法は，非特異

的産物の増幅を軽減させるといわれている．また，最後の伸長反応を長めにすると，heteroduplex の形成が避けられるといわれている（どちらの設定もおまじない程度と考え，過信しない方が良い）．

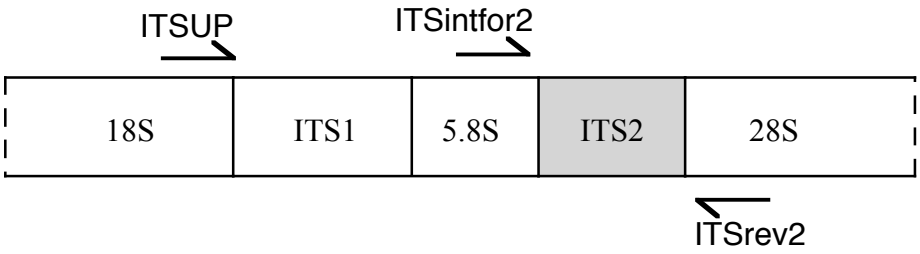
3. PCR products 5μlを1% agarose gelで電気泳動し，目的の産物が増幅されているか確認する．

ITS2領域をITSintfor2/ITSrev2GCで増幅した場合，約300bpの増幅産物が得られる．

4. PCR産物は2.3もしくは2.4項を参照して，精製，濃縮する． PCR産物45μlの場合，最終的に12μlのDWに溶解し，そのうち1μlはチェックの為に電気泳動する．DGGEにはそのうち5μl泳動すれば十分．

＊genomic DNAを鋳型としてPCRを行い，ITS2領域が増幅できない場合

genomic DNAを鋳型として，上記の条件でPCR増幅を行ってもPCR産物が得られないことがある．その場合，一回ITS領域全長 (ITS1 – 5.8S – ITS2)を増幅し，そのPCR産物を鋳型としてGC-clump付きITS2領域を増幅する．



図．rDNAの模式図とプライマーの位置

5. ITS領域全長のPCR

zoox specific primer (ITSUP, Santos et al. 2001, ITSrev2, LaJeunesse and Trench 2000)

ITSUP (5'-CCG GTG AAT TAT TCG GAC TGA CGC AGT GCT-3')

ITSrev2 (5'-GGG ATC CAT ATG CTT AAG TTC AGC GGG GT-3')

5.1 PCR反応液

Reagent		For 25μl PCR
	Template DNA	Xμl(3-25 ng)
2)	10 X PCR buffer	2.5 μl
3)	dNTP (2.5mM each)	2 μl
4)	primer 1 (10 pmol)	0.5 μl
5)	primer 2 (10 pmol)	0.5 μl
6)	*Taq* polymerase (5U/μl)	0.125 μl
1)	dH_2O	Up to 25 μl

5.2 サーマルサイクラーが94℃に上がってから，チューブをセットする．

Cycle

94°C	5:00 min	1 cycle
↓		
94°C	0:30 min	
55°C	0:30 min	30 cycles
72°C	1:30 min	
↓		
72°C	10:00	1 cycle
↓		
4°C	hold	

6. GC-clump付きITS2領域のPCR

上記のプライマーセットITSintfor2/ITSrev2GCを用いて，touch down法によりITS2領域を増幅する．

PCR反応液

Reagent		For 50µl PCR
	PCR products	0.5 µl
2)	10 X PCR buffer	5 µl
3)	dNTP (2.5mM each)	4 µl
4)	primer1 (10 pmol)	1 µl
5)	primer2 (10 pmol)	1 µl
6)	*Taq* polymerase (5U/µl)	0.25 µl
1)	dH_2O	36.25 µl

3.2 Preparation of gradient gel

DGGEの流れ

１．変性剤濃度勾配アクリルアミドゲルの溶液を準備
　BIO-RAD DCode system を用いた ITS2 領域 PCR-DGGE の変性剤濃度勾配ゲルは 8% acrylamide, 30-60% gradient (Sampayo et al. 2007)

２．ゲルカセットの組み立て

３．Gradient gel の流し込み，重合(1-2 時間) <ここまで約 3 時間>

４．サンプルのアプライ ＜約 30 分＞

５．電気泳動 ＜12 時間(o/n)＞

６．ゲルの染色，写真撮影 ＜約 1 時間＞

以下，必要に応じて

７．ゲルの切り出し

８．DNA 断片の再増幅

1. 試薬の準備

a. 40% Acrylamide/Bis (37.5:1)

Reagent	Amount
Acrylamide	38.93 g
Bis-acrylamide	1.07 g
dH_2O	Up to 100.0ml

0.45μm pore のフィルターで濾過．遮光して 4ºC で保存．約 1 ヶ月保存可．

8%のアクリルアミドゲル作成の場合，プレート 1 枚につき約 7.5ml 使用．ストックを作りすぎないように考えて調整すること．

単体（モノマー）のアクリルアミドは神経毒である．粉末および溶液のアクリルアミドの取り扱いは手袋（眼鏡）を装着して最新の注意を払うこと．

b. DCode Dye Solution

Reagent	Amount	Final Conc.
Bromophenol Blue	0.05 g	0.5%
Xylene Cyanol	0.05 g	0.5%
1X TAE buffer	10.0 ml	1X

c. 2X Gel Loading Solution

Reagent	Amount	Final concentration
2% Bromophenol Blue	0.25 ml	0.05%
2% Xylene Cyanol	0.25 ml	0.05%
100% Glycerol	7.0 ml	70%
dH_2O	2.5 ml	
Total volume	10.0 ml	

d. DNA marker

ゲルに変性剤の濃度勾配がかかっているので，泳動距離と分子量に相関はないが，ゲルごとの泳動状況のチェックやバンドの比較の目安として，毎回同じDNA断片を流すことを勧める．1レーンあたり1.5-2μgとかなり大量のDNAを泳動するので，自作のDNAマーカーを作成する．

1. 試薬の調整

Reagent	Amount	Final Conc.
λ DNA (0.3μg/μl)	200 μl	(60 μg)
10X *Taq* I buffer	40 μl	1X
0.1% BSA	40 μl	0.01%
Taq I (10U/μl)	16 μl	
dH_2O	104 μl	

上記の試薬を混ぜ，100 μlずつ0.2mlPCR用チューブに分注する．

2. 65℃で3時間反応後，95℃で10分加熱（酵素を失活させるため）．

3. エタノール沈殿を行い，120 μlのTEに溶解(最終濃度0.5μg/μl)．
このマーカーを1レーンあたり3μl(1.5μg相当)泳動する．

以下の試薬は当日調整

e. 10% APS (Ammonium Persulfate)

Reagent	Amount	
	For one plate	For two plates
Ammonium Persulfate	(約)0.5 g	(約)0.8 g
dH_2O	500 μl	800 μl

f. 0% Denaturing solution

Reagent	Amount		Final Conc.
	One plate	Two plates	
40% Acrylamide/Bis	4 ml	7.4 ml	8%
50X TAE buffer	400 µl	740 µl	1X
dH_2O up to	20 ml	37 ml	

g. 100% Denaturing solution

Reagent	Amount		Final Conc.
	One plate	Two plates	
40% Acrylamide/Bis	3.2 ml	6 ml	8%
50X TAE buffer	320 µl	600 µl	1X
Formaide	6.4 ml	12 ml	40%
Urea	6.72 g	13.44 g	7M
dH_2O up to	16 ml	37 ml	

Urea が溶解しにくいので，ホットスターラーで温めながら溶解するよと良い(ただし，沸騰しないよう注意！).

2.ゲルカセットの組み立て

複雑なので，装置付属の取扱説明書参照.

用意するもの

キムワイプ，キムタオル

100%エタノール入りの洗ビン

MilliQ 水入りの洗ビン

96 穴の PCR チューブ立て４つ

3. 濃度勾配ゲルの作成

これも，詳しくは取扱説明書参照.

コツ：カムと注射針をテープで止めるとよい.

3.2 high solution，low solution の調整

以下の割合で 0%および 100% solution を 50ml ファルコンチューブに混ぜる.

	High soln.	Low soln.
0% denaturing soln.	6.4 ml	11.2 ml
100% denaturing soln.	9.6 ml	4.8 ml
DCode Dye soln.	320 µl	
total	16 ml + α	16 ml

3.3 high solution のセット

3.3.1 high solution (16ml)に TEMD 14.4µl 加え，泡立てないように 10 回転倒混和.

3.3.2 10%APS を 144µl 加え，泡立てないように 10 回転倒混和.

この段階からアクリルアミドの重合が始まるので，慌てず，モタモタせず作業を進める．気温（室温）が高いと重合反応が早く進むので夏場は注意.

3.3.3 タイゴンチューブを装着したシリンジに, 空気が入らないように溶液を吸い取りカムにセットする.

3.4 low solution のセット

3.3 と同じ作業を行い，カムにセットする.

3.5 ゲルの流し込み

3.5.1 一定速度でカムをまわしてシリンジ内の溶液をゲルカセットに流し込む.

3.5.2 シリンジ内に残ったゲルは全て他の容器に出し切り，すぐにチューブ，シリンジを水道水ですすぐ（この作業を最も優先しないと，シリンジ，タイゴンチューブ，および Y 字フィット内でアクリルアミドが重合してしまい使えなくなる）.

3.5.3 コームをガラス板に差し込む.

3.6 泳動槽に 7L の 1X TAE buffer を入れ加温.

buffer の量が多いので，なかなか温度が上がらない(2-3 時間かかる)．冬場は特に注意．サンプルをアプライするときに buffer の温度が下がるので，最初に泳動温度より 5-10 度高く設定しておくと良い.

4. 試料のアプライ

4.1 ゲルが重合しているのを確認したら，コームを静かに外す.

4.2 ウェル内に残っている未重合のアクリルアミドを 1X TAE buffer で洗浄.

4.3. 変性剤濃度勾配ゲルを泳動槽にセット（詳しくは取扱説明書参照）.

4.4 試料(PCR 産物 25μl 分を精製し 5μl 分に濃縮したもの)と等量の 2X Loading Dye を混ぜ，ウェルにアプライ.

4.5 自作の DNA マーカー(マーカー3μl + 2X Loading Dye3 μl)を両側にアプライ.

＊市販の酵素等に添付されてくる loading buffer はグリセロールの量が少ないため(グリセロール含有量 35-50%)，ウェル内でサンプルが浮いてきてしまうことがある．DGGE 専用の 2X Loading Dye (グリセロール含有量 70%)を調整し，使用することを勧める.

5. 電気泳動

泳動バッファーが設定温度(60ºC)になったら 100V で 12 時間泳動. DGGE の場合，温度も DNA 断片の変性に重要な要因となるので，必ず設定温度になるまで待つこと.

6. 染色

ゲルカセットからアクリルアミドゲルを外す．上下左右が分からなくならないよう，一カ所端を斜めに切るとよい．EtBr で 30 分染色後，UV イルミネーターで観察.

7. バンドの切り出し

I. すぐには PCR を行わず長期保存する場合

1. blue チップの先でゲルをくりぬき，1.5ml マイクロチューブに移す.
2. 軽く遠心してから TE を 20μl ずつ加え，4℃で保存.

*切り出すゲルの量を欲張るとコンタミネーションの原因となる．チップの先で十分.

II. すぐに DGGE ゲルから PCR を行う場合.

1. PCR チューブに dH_2O を 100μl ずつ入れておく.
2. blue チップの先でゲルをくりぬき，PCR チューブに移す.
3. dH_2O を捨て，PCR 反応液を 25μl ずつ加え，PCR 反応を行う.

すぐに PCR を行う場合でも，予備としてゲルの一部を上記の方法で保存しておく.

8. DNA断片の再増幅

Zoox specific ITS2 primer (LaJeunesse and Trench 2000)

ITSintfor2 (5'-GAA TTG CAG AAC TCC GTG-3')

ITSrev2 (5'-GGG ATC CAT ATG CTT AAG TTC AGC GGG GT-3')

8.1 PCR反応液

Reagent		For 25µl PCR
	Template DNA	Gel or 2 µl*
2)	10 X PCR buffer	2.5 µl
3)	dNTP (2.5mM each)	2 µl
4)	primer1 (10 pmol)	0.5 µl
1)	primer2 (10 pmol)	0.5 µl
6)	*Taq* polymerase (5U/µl)	0.125 µl
1)	dH_2O	Up to 25 µl

DGGE ゲルを鋳型とする場合は，total 25µl の PCR 反応液を加える．
DGGE ゲル保存液を鋳型とする場合は，DNA 溶出 TE 2µl を加える．

8.2 Cycle

94°C	5:00 min	1 cycle
↓		
94°C	0:30 min	35 cycles
52°C	0:30 min	
72°C	1:00 min	
↓		
72°C	10:00	1 cycle
↓		
4°C	hold	

8.3 PCR 増幅のチェック

8.4 PCR 産物のエタノール沈殿を行い，電気泳動によるチェックと，nano drop による濃度測定を行う．

4. Sequencing

4.1 Sequencing reaction Beckman 8880

詳しくは，キット(DTCS quick Start Master Mix)のプロトコールを参照のこと

<DNA template>

dsDNA (PCR 産物，精製済み in DW)　　6.5ng / 100bp
plasmid

1. sequencing reaction 反応液

Reagent		
	Template DNA	X µl
4)	DTCS quick Start Master Mix	2 µl
3)	5 X Seq buffer	1 µl
2)	primer (1.6pmol)	2 µl
1)	dH_2O	Up to 10 µl

2. thermal cycle program

96°C	0:20 min	30 cycles
50°C	0:20 min	
60°C	4:00 min	
↓		
4°C	hold	

3. エタノール沈殿

3.1 stop solutionの調整 (用事調整)

3M NaOAC (pH 5.2)	1µl/sample
100mM EDTA (pH 8.0)	1µl/sample
20mg/ml Glycogen	0.5µl/sample

3.2 sequencing reaction反応後のサンプルにstop solution 2.5µlずつ加える．さらに100% EtOH 30µl加える．

3.3 centrifuge: 14,500rpm, 4C°, 15 min

3.4 溶液を捨てる(DNAは沈殿物として，チューブの管壁に密着しているが，滑りやすいので注意する)．

3.5 rinse (70% EtOH) 125µl
centrifuge 12,000rpm, 4C°, 3min

3.6 溶液を捨てる(DNAは沈殿物として，チューブの管壁に密着しているが，滑りやすいので注意する)．

3.7 rinse 2回目(70% EtOH) 125μl
centrifuge 12,000rpm, 4C°, 3min

3.8 溶液を捨てる.

3.9 dry（真空ポンプで6-7分，もしくは室温放置1-2時間）

3.10 30μl SLS（市販の脱イオンホルムアミドでも良い）に溶解.
この状態で，遮光して4°Cで１週間，-20°Cで約1ヶ月保存可.

3.11 96穴のシークエンス用PCRプレートに全量移す.

3.12 ミネラルオイルを一滴ずつ滴下.

4. separation buffer の準備

96 穴のプレートにウェルの 80%ぐらいになるよう,セパレーションバッファーを滴下.

4.2 CEQ 8800 簡易操作マニュアル

本体の操作

1． PC main switch ON

Ctr + Alt + Del

Pass word ⟶ 特に入力せず return

CEQ 8800 main switch ON

2． メイン画面右上, icon CEQ click

3． Icon Run click

(ソフトウエアの立ち上げ,Error message は無視してよい. OK を click)

Tab Direct Control click

4． Gel cartridge のセット ⟶

[gel cartridge]の icon を click

（＊ここで DONE を押してはいけない)

本体のふたを開け, 黒いレバーを手前に引く（レバーは回さない).

黒いレバーを手前に回してダミーカートリッジを抜き取る.

ゲルカートリッジを入れる.

ゲルカートリッジの Cap をダミーカートリッジに装着する.

本体のふたを閉める.

[Lot Number], [Hours on Instrument]を入力する.

DONE click

Tab Life click ゲルの Remaining を確認する. ゲルは 1 Run あたり, 約 0.8ml 消費する.

5．Sample tray, separation buffer のセット

Tag Access plate (画面左下)click.

Start click.

画面上に GO の表示が出るまで待つ.

本体のふたを開ける.

Wetting tray の DW を change する.

Sample tray をセットする (well A1 が右奥になるようにセット).

Buffer tray をセットし，白いふたをする．

本体のふたを閉める．

Plate を選択する（Right Plate の □ plate Loaded と ◯ Immerse Capillaries を check する）．

Load click

Sample Data の入力

Main menu

icon SET UP click

create a new sample plate → OK

1．Sample sheet に data を入力する．

2．Cell を選択（lane 単位で選択可能）して，泳動 Method を選択（通常は LFR-1）．

3．Cell を選択して（well 単位で選択可能），<Tab> Analysis を click，

Perform Analysis を check して，

Parameter Set default Sequence Analysis Parameter を select．

4．Tool bar File → save as

[project name]を選択し，Fail 名を入力して，OK click．

5．Run sample plates を click

Save to project でデータを保存したい project を選択（ここで project を選択しないと，泳動後のデータは default folder に入ります．）

Plate Load を click

6．OK

後片付け

1，Run control click
Tab Direct Control click

2．Dummy cartridge　のセット
Tab Life click ゲルの Remaining をメモする.
Icon gel cartridge click ⟶ OK click
画面上に GO の表示が出るまで待つ.
本体のふたを開け，黒いレバーを手前に引く（レバーは回さない).
黒いレバーを回してゲルカートリッジを抜き取る.
ダミーカートリッジを入れる.
ダミーカートリッジの Cap をゲルカートリッジに装着する.
本体のふたを閉める.
Install plug click

3．Sample tray, separation buffer の取り出し
Tag Access plate (画面左下)click.
Start click
画面上に GO の表示が出るまで待つ.
本体のふたを開ける.
Sample tray と Buffer Tray を取り出す.
本体のふたを閉める.
Plate を select する (Right Plate の plate Loaded と Immerse Capillaries を check する).
Load or Cancel click

4．CEQ8800 本体 Main switch OFF

5.PCR産物のサブクローニング

詳しくは使用する試薬またはキットのプロトコールを参照のこと.

１．PCR産物を得る

実験によっては，ゲルから抽出する.

２．Ligation: ベクターにPCR産物(insert)を組み込む.

一般的にはTA-cloningが簡便.

ベクターとインサートのモル比は1:3が望ましい.

invitrogen TOPO TA cloning kit for sequencing キットを用いた場合,

reagent	Amount
Vector pCR 2.1(3956bp 10ng/µl)	1 µl
Salt solution	1 µl
DNA	11.7 ng/100bp <4µl
dH_2O	Up to 6 µl

室温で 5-30 分放置.

３．培地を作る

一般的には LB 培地を用いる．使用する大腸菌に最適の培地を確認すること.

3.1 LB 平板培地の組成 1L

reagent	Amount	Final Conc.
Bacto tryptone	10 g	1%
Bacto yeast extract	5 g	0.5%
NaCl	10 g	1%
5N NaOH	0.2 ml	
Bacto-agar	15 g	1.5%

3.2 オートクレーブ(120 度，20 分)後，65 度程度に冷めたら，必要に応じて抗生物質を加える

invitrogen TOPO TA cloning kit for sequencing を用いた場合，ベクター(pCR2.1)はアンピシリンとカナマイシン耐性なので，50mg/ml のアンピシリン（凍結保存）を培地１L あたり，1ml（使用濃度 50µg/ml)になるように加える.

3.3 ディスポーザブルのプラスチックシャーレ（一般的には直径 90mm,高さ 15mm）に分注する（シャーレ１枚当たり，培地 20-25ml がよい).

Blue-White セレクションを行う場合は 20mg/ml X-gal in ジメチルホルムアミドを，最終濃度 50µg/ml になるように塗布する.

４．形質転換

4.1 コンピテントセルに ligation sample を泡立てないように加え，氷上で 30 分放置.

invitrogen TOPO TA cloning kit for sequencing を用いた場合，
コンピテントセル 25µl に ligation sample 1µl 加える

4.2 heat shock: 42 度のウォーターバスで 30 秒処理. すぐに on ice.

4.3 SOC(kit 添付)125µl 加え，37 度で 1 時間培養.

4.4 LB 平板培地に塗布（1 枚は 125µl,もう一枚は 25µl 塗布する）.

4.5 14-18 時間培養（インサートによりコロニーの生育の具合は異なる）.

５．コロニーPCR

Blue-White セレクションを行った場合は，白いコロニーを爪楊枝でつつき，PCR 反応液中ですすぐ.

5.1 PCR反応液

primer

M13 Reverse primer; 5’-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3’

M13F Foroward (-20) primer; 5’-GTA AAA CGA CGG CA G-3’

Reagent		For 20µl PCR
	Template DNA	
2)	10 X PCR buffer	2 µl
3)	dNTP (2.5mM each)	1.6 µl
4)	primer1 (10pmol)	0.4 µl
5)	primer2 (10pmol)	0.4 µl
6)	*Taq* polymerase (5U/µl)	0.1 µl
1)	dH_2O	13.5 µl

5.2 Cycle

94°C	5:00 min	1 cycle
↓		
94°C	0:30 min	30 cycles
52°C	0:30 min	
72°C	X min *	
↓		
72°C	7:00	1 cycle
↓		
4°C	hold	

*伸長反応の時間はPCR産物の長さによる．目安としては1000bpにつき1minの伸長反応が必要．

5.3 PCR増幅のチェック

インサートが入っていなければ150-200bp辺りにバンドがある．インサートが入っていれば．インサートの長さ＋200bp（ベクターの分の長さ）の位置にバンドがある．

以下，精製してシーケンス反応等を行う．

6. Basic Reagents

CHAOS solution (not autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
Guanidine thiocyanate	50 g	4M
Salkosyl*	0.5 g	0.5%
Tris-HCl (pH 8.0)	1M stock 2.5 ml	25ml
2-Mercaptoethanol	0.7 ml	0.1M
dH_2O	Up to 100 ml	

Salkosyl = *N*-lauroy sarcoseine sodium = *N*-Dodecanoyl-*N*-methylglycine sodium,

2X CTAB solution (not autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
EDTA (pH 8.0)	0.5M stock 2 ml	20mM
Tris-HCl (pH 8.0)	1M stock 5 ml	100mM
NaCl	5M stock 14 ml	1.4M
CTAB	2 g	4%
dH_2O	Up to 50 ml	

CTABは発泡性があるので，オートクレーブしない.

EDTA, Tris, NaCl, dH_2Oは全て滅菌済みのstockを用いて試薬の調整を行う.

DNA extraction buffer (autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
EDTA (pH 8.0)	0.5M stock 5 ml	50mM
Tris-HCl (pH 8.0)	1M stock 2.5 ml	50mM
NaCl	2.34 g	0.4M
dH_2O	Up to 100 ml	

0.5M EDTA pH 8.0 (autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
EDTA*	186.1 g	1M
dH_2O	Up to 100 ml	

EDTA·2Na·$2H_2O$ (MW=372.24). 他にEDTA·4Na等があるので注意.

粒状のNaOHを入れてEDTAを溶かす（pHが低い状態では溶けない）.

pHメーターで測りながら，5N NaOHを加え調節する.

意外と加えるNaOHの量が多いので，最初に溶解する超純水の量に注意.

5M NaCl (autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
NaCl	14.6 g	5M
dH_2O	Up to 50 ml	

13% PEG solution (autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
PEG 8000	6.5 g	13%
NaCl	4.67 g	1.6M
dH_2O	Up to 50 ml	

10% SDS (not autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
SDS	5 g	10%
dH_2O	Up to 50 ml	

3M NaOAc (sodium acetate，酢酸ナトリウム)

Reagent	Amount	Final Conc.
$NaOAc•3H_2O$	20.4 g	3M
dH_2O	Up to 50 ml	

pHメーターで測りながら，酢酸を加えてpHを調整する.
意外と加える酢酸の量が少ないので，pH5.2に近づいて来たら希釈した酢酸を使って調整すると良い.

50 x TAE (autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
Tris	242 g	2M
Acetic acid（酢酸）	57.1 ml	2M
EDTA (pH 8.0)	Stock 0.5M 100 ml	0.05 M
dH_2O	Up to 1L	

5 x TBE (autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
Tris	54 g	0.445M
Boric acid（ホウ酸）	27.5 g	0.445M
EDTA (pH 8.0)	Stock 0.5M 20 ml	0.01 M
dH_2O	Up to 1L	

10 x TE (autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
Tirs (pH 8.0)	Stock 1M 5 ml	100mM
EDTA (pH 8.0)	Stock 0.5M 1 ml	10mM
dH_2O	44 mL	

1M Tris-HCl (pH 8.0) (autoclave)

Reagent	Amount	Final Conc.
Tirs	121.1 g	1M
dH_2O	Up to 1L	

HCl（塩酸）でpHを調整する．pH8.0に合わせる為に約42ml必要．
最初に溶解する超純水の量に要注意．